

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 1/20, A61K 35/74	A1	(11) 国際公開番号 WO99/28441 (43) 国際公開日 1999年6月10日(10.06.99)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05404</p> <p>(22) 国際出願日 1998年12月1日(01.12.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/330021 1997年12月1日(01.12.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 荒木 誠一 (ARAKI, Seichi)(JP/JP) 〒300-0810 茨城県土浦市永国台1-35 Ibaraki, (JP) 鈴木 護 (SUZUKI, Mamoru)(JP/JP) 〒305-0035 茨城県つくば市松代1-30-2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 古谷 馨, 外(FURUYA, Kaoru et al.) 〒103-0012 東京都中央区日本橋堀留町1-8-11 日本橋TMビル Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: NOVEL <i>BACILLUS SUBTILIS</i> WITH ANTIBACTERIAL EFFECTS</p> <p>(54) 発明の名称 抗菌作用を有する新規枯草菌</p> <p>(57) Abstract A novel antibacterial <i>Bacillus subtilis</i> strain, specifically <i>Bacillus subtilis</i> AS2 strain (accession number: FERM BP-6139) having such features that it exhibits potent antibacterial effects against deleterious bacteria of the genera <i>Salmonella</i>, <i>Escherichia</i>, <i>Shigella</i>, <i>Vibrio</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Clostridium</i>, and <i>Campylobacter</i> and that it does not exhibit such effects against lactic acid bacteria of the genera <i>Bifidobacterium</i> and <i>Lactobacillus</i> and <i>Bacillus natto</i>.</p> <div data-bbox="1349 1707 1954 2384"><p>大腸菌に対するAS2株の作用</p><p>a ... EFFECT OF AS2 STRAIN AGAINST <i>Escherichia coli</i></p><p>b ... CELL COUNT (CFU/ml)</p><p>c ... DAYS ELAPSED AFTER INITIATING MIX CULTURE</p><p>d ... <i>Bacillus subtilis</i> AS2 strain</p><p>e ... <i>Escherichia coli</i> E01292 strain</p></div>		

(57)要約

本発明は、抗菌作用を示す新規の枯草菌株を提供する。また、本発明のバチルス・ズブチリス・AS 2株（寄託番号FERM BP-6139）は、サルモネラ属、エッシェリシア属大腸菌、シゲラ属、ビブリオ属、ブドウ球菌属、クロストリジウム属、キャンピロバクター属などの有害菌に対して強い抗菌作用を示し、ビフィドバクテリウム属、ラクトバシルス属等の乳酸菌や納豆菌には作用しないという特長を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

明細書

抗菌作用を有する新規枯草菌

発明の属する技術分野

本発明は新規な枯草菌株を有効成分とする抗菌剤に関する。さらに詳しくは、枯草菌すなわちバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) の株の一種である A S 2 株を有効成分とする抗菌剤に関する。

従来技術

抗菌剤、抗真菌剤などの抗生物質が種々の感染症の予防や治療に有効であることは古くから知られており、現在まで臨床の場で広く使用されている。これらの抗生物質は細菌や真菌が生成するものを抽出したり、化学的に合成することによって得ることができる。しかし、同一系統の抗生物質を長期間反復して使用することにより、細菌が耐性を獲得して、薬剤を投与しても効果が発現できなくなる、いわゆる耐性菌の出現が深刻な社会問題となっている。

そこで、単一の化学物質からなる抗生剤ではなく、自然界に存在し、人や動物に対して悪影響を与えず、しかも有害な細菌のみに対して抗菌活性を示すものを探す試みがなされてきた。

微生物の中には、周囲にいる自分とは異なる種類の細菌を殺滅する物質を分泌するものがある。ペニシリンを生成するペニシリウム・ノタツム (*Penicillium notatum*) やペニシリン・クリソゲナム (*P. chrysogenum*) などがそのよい例である。しかし、ペニシリンは広くグラム陽性菌に対して静菌・殺菌作用を示すため、選択性の点で問題がある。また、広範な範囲の細菌がペニシリンに対して耐性を獲得してしまうという問題点もある。

選択的スペクトルを有する物質を産生する微生物として、バチルス・ズブチ

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

リス (*Bacillus subtilis*) やバチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) 等の細菌が知られている。デュクルゾーらはバチルス・リケニフォルミスが、クロストリジウム・パーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*) の生育を抑制するバシトラシンを分泌することを報告している (Ducluzeau, R., et al., *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 9, 20-25, 1976)。また、特公平8-18996号公報には、枯草菌のIFO-3009株、IFO-3013株、IFO-3335株、IFO-3336株、IFO-3936株およびIFO-13169株を含む生菌剤を人に投与することによって、糞便中のクロストリジウム・パーフリンゲンスの菌数を減少させる効果があることが開示されている。さらに、特表平1-502340号公報には、バチルス・ズブチリス・TSMPPM No. V-2335がシュードモナス・アエルギノーザ、シゲラ・ソネイ、サルモネラ属、クレブシエラ・ニューモニア、プロテウス・ブルガリスに対して、バチルス・リケニフォルミス・TSMPPM No. V-2336がスタフィロコッカス・アウレウス、カンジダ・アルビカン、アスペルギルス・フラバスに対して拮抗作用を示し、家畜の胃腸病の予防治療に有効であると記載されている。

しかしながら、人や動物に対して病原性を示す細菌は、これらの細菌だけではない。人では致死的に作用することもある血清型O157:H7を初めとする病原性大腸菌、食中毒の原因となるビブリオ属、シゲラ属、エンテロコッカス属、カンピロバクター属等、家畜ではニワトリやブタに高頻度で感染しているサルモネラ属、ウシやヒツジ、ブタで流産を引き起こすカンピロバクター属、ウシの乳房炎の原因となるブドウ球菌属等、多数の細菌が人や家畜の体内、卵や食肉等の畜産製品、飼料、畜舎、土壌等に常在し、感染症を引き起こしているのが現状である。したがって、種々の病原性菌に対して、従来知られているバチルス属細菌株よりも強い抗菌活性を示し、しかも乳酸菌群や納豆菌等の有用な細菌には作用しない新規な細菌株の開発が待たれている。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

発明の開示

本発明者らは、これらの背景に基づき長年に渡り鋭意研究を進めてきた結果、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) の一種である A S 2 株が、サルモネラ、大腸菌、ブドウ球菌、腸炎ビブリオ菌、キャンピロバクター、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌等種々の有害細菌に対して、従来知られている細菌株よりも強い抗菌活性を示し、しかも乳酸菌や納豆菌等の有用な細菌には作用しないことを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、1) ラクトースおよびアミグダリン利用能を有し、イヌリン利用能を有さないこと、オルソニトロフェノール- β -D-ガラクトピラノシドテストが陰性であること、50℃で生育しないことを特徴とするバチルス・ズブチリス・A S 2 株 (*Bacillus subtilis* AS2)、寄託番号 F E R M B P - 6 1 3 9、2) 配列番号 1 に示した 1 6 S リボソーム RNA の塩基配列を有するバチルス・ズブチリス・A S 2 株 (*Bacillus subtilis* AS2)、寄託番号 F E R M B P - 6 1 3 9、3) 同 A S 2 株の生菌、死菌または菌体成分を有効成分とする抗菌剤、4) 該抗菌剤を含む食品、5) 該抗菌剤を含む家畜または養殖魚用飼料、6) A S 2 株を含む感染症予防治療剤、7) A S 2 株を含む抗下痢、整腸剤、8) A S 2 株を含む糞便の消臭剤、9) A S 2 株を含む成長促進剤、10) A S 2 株を含む抗癌剤投与時の副作用軽減剤である。

なお、バチルス・ズブチリス・A S 2 株は、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 在 工業技術院生命工学工業技術研究所 (F E R M) に 1997 年 10 月 9 日に寄託されており、その寄託番号は F E R M B P - 6 1 3 9 である。

本明細書中ではバチルス・ズブチリス・A S 2 株を、枯草菌 A S 2 株、または A S 2 株と略記することがある。

本発明に係るバチルス・ズブチリス・A S 2 株は下記の性質を有する。

- (1) グラム陽性、好気性桿菌、(2) 卵円形の芽胞を形成する、(3) 運動性有り、
- (4) カタラーゼ陽性、(5) V P 反応：+、(6) 50℃における発育：-、(7) 7 % 塩

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

化ナトリウム添加培地における発育：＋、(8) デンプン加水分解：＋、(9) サブローデキストロースの利用：＋、(10) Egg yolk：＋、(11) カゼイン加水分解：＋、(12) クエン酸塩の利用：＋、(13) 硝酸塩の還元：＋、(14) 馬尿酸塩の還元：＋、(15) チロシンの利用：＋、(16) グルコースからのガス産生、(17) o-ニトロフェノール- β -D-ガラクトピラノシド：－、(18) ADH：－、(19) LDC：－、(20) ODC：－、(21) シモンのクエン酸塩の利用：－、(22) クリスチャンセンのクエン酸塩の利用：＋、(23) 硫化水素産生：－、(24) ウレアーゼ産生：－、(25) TDA：－、(26) インドール産生：－、(27) ゼラチン加水分解：＋、(28) 液体培地における皮膜形成：＋、(29) 牛乳の凝固：－、(30) 牛乳のペプトン化：＋、(31) pH5.7における発育：＋、(32) 糖類からの酸産生：エリスリトール、L-アラビノース、リボース、D-キシロース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、セロビオース、マルトース、ラクトース、メリビオース、サッカロース、トレハロース、D-ラフィノース、グリコーゲン、 β -ゲンチオビオース、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、 α -メチル-D-グルコシド、アミグダリン、アルブチン、イースクリン、サリシン、D-トウラノース：＋、グリセロール、D-アラビノース、L-キシロース、アドニトール、 β -メチルキシロシド、ガラクトース、イヌリン、メレジトース、キシリトール、L-ソルボース、ラムノース、ドゥルシトール、 α -メチル-D-マンノシド、N-アセチルグルコサミン、D-リキソース、D-タガトース、D-フコース、L-フコース、D-アラビトール、L-アラビトール、グルコネート、2-ケトグルコネート、5-ケトグルコネート：－。

これらの性質のうち、50℃において発育しない、o-ニトロフェノール- β -D-ガラクトピラノシド：－、またはラクトースおよびアミグダリン利用能を有し、かつイヌリン利用能を有さないという点で、一般のバチルス・ズブチリスとは異なる性質を持つ新規な菌株である。

また、AS 2株は16SリボゾームRNAとして、配列番号1に示した塩基配列を

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

有する。この塩基配列は実質的にその性質が変化しない範囲内で、一部の核酸が置換・付加・欠失されていてもよい。

本発明は、上記のパチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分を提供する。この菌体成分を有効成分とする抗菌剤も提供する。

更に、作用を増強する賦形剤とこの抗菌剤を含む抗菌剤組成物を提供し、賦形剤として酵母が好ましい。

又、本発明は、上記の菌体成分を有効成分として含む免疫増強剤、上記の菌体成分の抗菌有効量を抗菌を必要とする場所に適用することによる抗菌方法、上記の菌体成分の有効量を人または動物に投与して、感染症を予防または治療する方法、上記の菌体成分の有効量を人または動物に投与して、免疫を増強する方法、上記の菌体成分の有効量を人または動物に投与して、下痢を予防または治療または整腸する方法、上記の菌体成分の有効量を人または動物に投与して、糞便を消臭する方法、上記の菌体成分の有効量を人または動物に投与して、成長を促進する方法、上記の菌体成分の有効量を人または動物に投与して、抗癌剤の投与に伴う副作用を軽減する方法、上記の抗菌剤と食品を含む食用製品および上記の抗菌剤と家畜または養殖魚用飼料とを含む飼料製品を提供する。

枯草菌A S 2株が抗菌活性を示す細菌の種類としては、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、サルモネラ・ティフィ (*S. typhi*)、サルモネラ・パラティフィ (*S. paratyphi*)、サルモネラ・コレラスイス (*S. choleraesuis*)、サルモネラ・エンテリティディス (*S. enteritidis*)、サルモネラ・ガリナルム (*S. gallinarum*)、サルモネラ・アボルタセクイ (*S. abortusequi*)、サルモネラ・アボルタソビス (*S. abortusovis*)、サルモネラ・ダブリン (*S. dublin*) 等のサルモネラ属、毒素原性・組織侵入性・病原血清型・腸管出血性・腸管付着性等の病原性大腸菌を含むエッシェリシア属大腸菌 (*Escherichia coli*)、シゲラ・ソネイ (*Shigella sonnei*)、シゲラ・ディセンテリ (*S. dysenteriae*)、シゲラ・フレクスネリ (*S. flexneri*)、シゲラ・

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

ボイディ (*S. boydii*) 等のシゲラ属、セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*)、セラチア・ルビダイ (*S. rubidaea*) 等のセラチア属、ビブリオ・コレライ (*Vibrio cholerae*)、ビブリオ・パラヘモリティクス (*V. parahaemolyticus*) 等のビブリオ属、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*S. epidermidis*) 等のブドウ球菌属、クロストリジウム・パーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・ショベイ (*C. chauvoei*)、クロストリジウム・ボツリナム (*C. botulinum*)、クロストリジウム・テタニ (*C. tetani*)、クロストリジウム・セプチカム (*C. septicum*) 等のクロストリジウム属、キャンピロバクター・フィータス (*Campylobacter fetus*)、キャンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*)、キャンピロバクター・スプトルム (*C. sputorum*)、キャンピロバクター・ムコサリス (*C. mucosalis*)、キャンピロバクター・フィーカリス (*C. faecalis*) 等のキャンピロバクター属、エルシニア・ペスティス (*Yersinia pestis*)、エルシニア・シュードツベルクロシス (*Y. pseudotuberculosis*)、エルシニア・エンテロコリティカ (*Y. enterocolitica*) 等のエルシニア属、エンテロバクター・クロアカイ (*Enterobacter cloacae*) 等のエンテロバクター属、シトロバクター・フレウンディ (*Citrobacter freundii*) 等のシトロバクター属、プロテウス属 (*Proteus*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、フソバクテリウム属 (*Fusobacterium*) などが挙げられる。特にメチシリン耐性ブドウ球菌 (Meticillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、マクロライド耐性のエンテロコッカス・セリオリシダ (*Enterococcus seriolicida*)、大腸菌血清型O26、O111、O157等に抗菌活性を示すという特長がある。

一方、本菌株はビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ブレーブ (*B. breve*) 等のビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス・ブルガ

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

リクス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*L. acidophilus*) 等のラクトバチルス属、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 等、いわゆる乳酸菌と呼ばれている細菌群やバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属などの有用な細菌に対しては抗菌活性を示さない。

本発明に係る抗菌剤の投与方法としては、投与目的、症状等の条件によって異なるが経口投与、または食品、飼料、飲水等に混じて摂取させる方法が挙げられる。

人や動物において、細菌の感染が成立していない時または治癒後に投与する場合には予防剤としての形態であり、感染後および発症中に投与する場合には治療剤としての使用である。投与量はその目的、対象動物、疾患の種類、病態によって異なるが、経口投与の場合には1回当たり菌数として、 $1 \times 10^2 \sim 10^{11}$ 個、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 10^{11}$ 個、さらに好ましくは $1 \times 10^7 \sim 10^9$ 個である。

本発明に係る抗菌剤は、生菌のまま投与してもよく死菌の状態でもよい。また、凍結、加熱、乾燥、薬物暴露等の処理をして菌体が分解した状態であっても、その成分が保持されていれば差し支えない。

また、通常用いられる製剤用担体によって、公知の方法により散剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤とすることもでき、食品や飼料、飲水等に混合することもできる。

経口用製剤を調製する場合には、主薬に賦形剤、結合剤、粘結剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、抗酸化剤、溶解補助剤などを加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などとする。

上記賦形剤としては、デンプン、コーンスターチ、デキストリン、酵母エキスパウダー、小麦粉、小麦ミドリング、ふすま、米ぬか、米ぬか油かす、大豆かす、大豆粉、大豆油かす、きな粉、ブドウ糖、乳糖、白糖、マルトース、植物油、動物油、硬化油、高級飽和脂肪酸、脂肪酸、マンニトール、結晶セルロース、

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

二酸化珪素、無水珪素、珪酸カルシウム、珪酸、リン酸一水素カルシウム、第二リン酸カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム、リン酸第二水素カルシウムなどが用いられる。

結合剤としてはポリビニルピロリドン、エチルセルロース、メチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、カゼインナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロピレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウムなどが用いられる。

滑沢剤としてはステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸などが用いられる。

着色剤、着香料としては医薬品、飼料に添加することが許可されているものであればよく、特に限定されない。抗酸化剤としてはアスコルビン酸、 α -トコフェロール、エトキシキン、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール等医薬品や飼料に添加することが許可されているものであればよい。また、錠剤、顆粒剤は必要に応じてコーティングしてもよい。

液剤を製造する場合には、必要に応じて主薬にpH調製剤、緩衝剤、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、抗酸化剤、保存剤などを添加し、常法により製造することができる。この際必要に応じ、凍結乾燥剤とすることも可能である。

本発明に係るバチルス・ズブチリス・A S 2株の培養は、通常行われる方法を用いればよい。たとえば、培養温度10~45℃、pH5~8、好氣的条件下で、寒天培地、血液寒天培地、ハートインフュージョン培地、トリプトソーヤ培地、サブロー寒天培地、ブレインハートインフュージョン液体培地等の培地で容易に培養可能である。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

図面の簡単な説明

図1は、バチルス・ズブチリス・AS2株の大腸菌に対する作用を示した図である。

図2は、バチルス・ズブチリス・ナットー株の大腸菌に対する作用を示した図である。

図3は、バチルス・ズブチリス・AS2株、IFO-3009株、PCI219株の大腸菌に対する殺菌作用を示した図である。

図4は、バチルス・ズブチリス・AS2株、IFO-3009株、PCI219株のサルモネラ菌に対する殺菌作用を示した図である。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 AS2株の一般細菌に対する抗菌作用

バチルス・ズブチリス・AS2株の家畜由来の一般細菌に対する抗菌作用の有無を十字画線接種法によって調べた。まず、ミュラーヒントン寒天培地上に、表1に示した一般細菌を直線的に接種し、それに十字に交差するようにAS2株を直線的に接種し、37℃で24時間培養した。その後、交差部分の一般細菌の生育状態を観察した。その結果を表1に示した。

表1 バチルス・ズブチリス・AS2株の一般細菌に対する抑制作用

細菌名	発育阻止作用
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	×
<i>Psendomonas aeruginosa</i> No. 2	×

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

Bordetella bronchiseptica 1	×
Bordetella bronchiseptica 2	×
Bordetella bronchiseptica 3	×
Escherichia coli NIHJ	◎
Escherichia coli C-1	○
Escherichia coli C-2	○
Escherichia coli C-3	○
Escherichia coli TK-18A	○
Escherichia coli E01292	◎
Klebsiella pneumoniae KC-1	×
Klebsiella pneumoniae C-1	×
Enterococcus cloacae	○
Serratia marcescens B204	○
Serratia marcescens H-1	○
Proteus vulgaris H-1	○
Salmonella typhimurium G-14	○
Salmonella enteritidis ATCC 14028	○
Staphylococcus aureus 209P	×
Staphylococcus aureus OB-72	△
Staphylococcus aureus OB-73	△
Staphylococcus aureus 9	×
Staphylococcus aureus 10	○
Staphylococcus aureus MRSA	△
Staphylococcus epidermidis KA-1	○
Streptococcus faecalis 10541	△
Streptococcus faecalis ATCC8043	×

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

Streptococcus faecium	×
Bacillus subtilis PC1219	×
Bacillus subtilis natto	×
Enterococcus seriolicida マクロライド 耐性	○
Clostridium perfringens	◎
Bifidobacterium spp.	×

◎：著効 ○：効果あり △：やや効果あり ×：無効

以上の結果から、本発明に係るバチルス・ズブチリス・AS 2株は、サルモネラ属、エッシェリシア属、エンテロバクター属、セラチア属、プロテウス属、ブドウ球菌属、エンテロコッカス属、クロストリジウム属等の細菌に対して抗菌作用を有し、ビフィズス菌や納豆菌等の有用な菌には作用しないことが明らかになった。

実施例2 AS 2株の食中毒関連細菌に対する抗菌作用

バチルス・ズブチリス・AS 2株の腸管出血性大腸菌、黄色ブドウ球菌、バチルス・セレウス、腸炎ビブリオ菌、エルシニア・エンテロコリチカに対する抗菌作用の有無を十字画線接種法によって調べた。まず、ミュラーヒントン寒天培地上に、表2に示した細菌を直線的に接種し、それに十字に交差するようにAS 2株を直線的に接種し、37℃で24時間培養した。その後、交差部分の一般細菌の生育状態を観察した。その結果を表2に示した。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

表2 バチルス・ズブチリス・AS2株による
食中毒関連細菌に対する発育抑制作用

細菌名	抑制作用
Escherichia coli O157:H7 (VT1、VT2)	+
Escherichia coli O157:H7 (ATCC43888)	+
Escherichia coli O111:HNM (VT1、VT2)	+
Escherichia coli O26:HNM (ATCC43888)	+
Staphylococcus aureus TSST-1	+
Staphylococcus aureus (MRSA)	+
Bacillus cereus (Emetic type)	+
Bacillus cereus (Diarrheal type)	+
Vibrio parahaemolyticus	+
Yersinia enterocolitica	+

＋：抑制作用有り

以上の結果から、本発明に係るバチルス・ズブチリス・AS2株は、腸管出血性大腸菌、腸炎ビブリオ菌等各種の食中毒関連細菌に対して抗菌作用を有することが明らかになった。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

実施例 3 A S 2 株の大腸菌に対する殺菌作用

バチルス・ズブチリス・A S 2 株の大腸菌・E01292株に対する殺菌作用を調べた。対照として市販されている納豆菌であるバチルス・ズブチリス・ナットー一株を使用した。

大腸菌をブレイン・ハート・インフュージョン（以下B H I）・ブロス培地（BBL社製）で37℃、18時間前培養し、100mlフラスコ中のB H I 培地30mlにそれぞれ単独またはA S 2 株とともに接種し、37℃の湯浴中で振盪培養した。混合培養開始前、1、2 および3 日後にサンプリングし、生理食塩液で10倍階段希釈系列を作出し、そのうち0.1mlを寒天培地に塗抹後、37℃で24時間培養して生菌数を計測した。大腸菌の分離にはマッコンキー寒天培地（BBL社製）を、バチルス・ズブチリスの分離にはサブロー寒天培地（日水製薬製）を用いた。

その結果を図1および図2に示した。A S 2 株と混合培養した大腸菌は、培養開始後1日から菌数が減少したのに対して、納豆菌と混合培養した大腸菌数には変化はみられなかった。

実施例 4 A S 2 株の大腸菌、サルモネラ菌に対する殺菌作用

バチルス・ズブチリス・A S 2 株の大腸菌・NIHJ株およびサルモネラ・エンテリティディス・ATCC14028株に対する殺菌作用を調べた。対照として一般の納豆菌であるバチルス・ズブチリス・IF0-3009株および一般的な枯草菌であるPC I219株を使用した。

大腸菌およびサルモネラ菌をB H I ブロス培地（BBL社製）を使用して37℃で18時間前培養し、100mlフラスコ中のB H I 培地30mlにそれぞれ単独またはA S 2 株とともに接種し、37℃の湯浴中で振盪培養した。培養開始前、1 日後および3 日後にサンプリングし、生理食塩液で10倍階段希釈系列を作出し、そのうち0.1mlを寒天培地に塗抹後、37℃で24時間培養して生菌数を計測した。大腸菌およびサルモネラ菌の分離にはマッコンキー寒天培地（BBL社製）を、バチルス・ズブチリスの分離にはサブロー寒天培地（日水製薬製）を用いた。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

その結果を図3および図4に示した。大腸菌またはサルモネラ菌は、IFO-3009株またはPCI219株と混合培養した場合には増加したのに対して、AS2株と混合培養した場合には明らかに減少した。

以上の結果より、大腸菌やサルモネラ菌等の有害細菌に対する殺菌作用は、バチルス・ズブチリス全般に共通するものではなく、AS2株に特異的なものであると考えられた。

実施例5 AS2株を人工摂取させた際の腸管への定着性

25例のマウスに 10^8 CFU/ml (0.05ml)の生理食塩液に懸濁)のバチルス・ズブチリス・AS2株を、5日間経口投与した。最終投与日を0日として起算し、第1、2、3、5および7日に、各5例のマウスをペントバルビタール・ナトリウムの過麻酔で致死させ、剖検して腸内容物を採取した。内容物を平板寒天培地で24時間培養したところ、全ての採取日でAS2株が検出された。すなわち、AS2株には腸管定着性があることが明らかになった。

実施例6 AS2株と他の枯草菌株の抗菌作用の比較

バチルス・ズブチリス・AS2株、IFO-3009株、IFO-3013株、IFO-3336株、IFO-3936株、IFO-13169株およびPCI219株(ATCC6633)のクロストリジウム・パーフリンゲンス・NCTC3182 Type Cに対する抗菌作用を比較した。

ミューラーヒント寒天培地(BBL社製)に、上記クロストリジウムを画線培養し、バチルス・ズブチリスの各菌株を十字交差接種した。ガスパック(BBL社製)で37℃、24時間培養後、交差部分の阻止帯を観察した。その結果、AS2株はクロストリジウム・パーフリンゲンスの増殖を強く抑制したのに対して、他の株ではいずれも増殖作用はみられなかった(表3)。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

表 3 *Bacillus subtilis* のカストリジウム・パーフリンゲンに対する発育抑制作用

細菌名	増殖抑制作用
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-3009	×
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-3013	×
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-3336	×
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-3936	×
<i>Bacillus subtilis</i> IFO-13169	×
<i>Bacillus subtilis</i> PCI219 (ATCC6633)	×
<i>Bacillus subtilis</i> AS2	◎

◎：強い抑制作用あり ×：抑制作用なし

実施例 7 *AS2* 株の大腸菌静脈内感染に対する防御効果

一群各10例の雄マウス（SLC:ICR、5週齢）に生理食塩液に懸濁した *AS2* 株 10^7 、 10^8 または 10^9 CFU/0.5ml を3日間連続経口投与して、最終投与24時間後に生理食塩液に懸濁したヒト由来大腸菌 E01292 株 4.0×10^7 CFU/0.2ml を静脈内投与した。菌接種4日後のマウスの生存率を算出し、防御効果を判定した。その結果、*AS2* 株を予防的に投与することにより、大腸菌感染に対するマウスの感染抵抗性が増強され、対照群と比較して、有意な生存率の上昇が認められた。すなわち、*AS2* 株は免疫増強作用を示すことが示唆された（表4）。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

表4 バチルス・スブチリス・AS2株の大腸菌に対する感染防御効果

試験群	生残数 (率、%)
対照群	0 / 10 (0)
AS2株 10 ⁷ CFU/mouse	3 / 10 (30)
10 ⁸ CFU/mouse	5 / 10 (50) *
10 ⁹ CFU/mouse	8 / 10 (80) **

 χ^2 テスト、**: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.05$

実施例8 AS2株の黄色ブドウ球菌静脈内感染に対する防御効果

一群各10例の雄マウス (SLC:ICR、5週齢) に生理食塩液に懸濁したAS2株 10⁷、10⁸または10⁹CFU/0.5mlを6日間連続経口投与して、投与4日目に生理食塩液に懸濁したウシ乳房炎由来黄色ブドウ球菌0B-72株 6.5×10⁷CFU/0.2mlを静脈内投与した。AS2株最終投与から7日後のマウスの生残率を算出し、防御効果を判定した (表5)。

表5 バチルス・スブチリス・AS2株の黄色ブドウ球菌に対する感染防御効果

試験群	生残数 (率、%)
対照群	0 / 10 (0)
AS2株 10 ⁷ CFU/mouse	5 / 10 (50) *
10 ⁸ CFU/mouse	8 / 10 (80) **
10 ⁹ CFU/mouse	10 / 10 (100) **

 χ^2 テスト、**: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.05$

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

実施例 9 AS 2 株のオーエスキーウイルス皮下感染に対する防御効果

一群各10例の雄マウス（SLC:ICR、5週齢）に生理食塩液に懸濁したAS 2 株 10^7 、 10^8 または 10^9 CFU/0.5mlを6日間連続経口投与して、投与4日目に生理食塩液に懸濁したブタ由来オーエスキーウイルス 133PFU/0.2mlを皮下投与した。ウイルス液接種から7日後のマウスの生残率を算出し、防御効果を判定した（表6）。

表6 パチルス・ス・パチルス・AS2株のオーエスキーウイルスに対する
感染防御効果

試験群	生残数（率、%）
対照群	0 / 10（0）
AS 2 株 10^7 CFU/mouse	1 / 10（10）
10^8 CFU/mouse	4 / 10（40）*
10^9 CFU/mouse	6 / 10（60）**

χ^2 テスト、**: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.05$

実施例 10 AS 2 株のリポポリサッカライド（LPS）静脈内接種に対する防御効果

一群各10例の雄マウス（SLC:ICR、5週齢）に生理食塩液に懸濁したAS 2 株 10^7 、 10^8 または 10^9 CFU/0.5mlを経口投与し、24時間後に大腸菌由来LPS 50 mg/kgを尾静脈内に投与し、さらにその6時間後に同用量のAS 2 株をそれぞれ経口投与した。LPS液接種から4日後のマウスの生残率を算出し、防御効果を判定した（表7）。

表 7 バチルス・ズブチルス・AS2株のイントキシンに対する防御効果

試験群	生残数 (率、%)
対照群	1 / 10 (10)
A S 2 株 10 ⁷ CFU/mouse	1 / 10 (10)
10 ⁸ CFU/mouse	3 / 10 (30)
10 ⁹ CFU/mouse	7 / 10 (70) **

χ^2 テスト、 **:p<0. 01

実施例 1 1 A S 2 株の抗下痢作用

バチルス・ズブチルス・A S 2 株のマウス L P S 下痢発生モデルに対する効果を検討した。6 週齢の雄マウス (Slc:ICR) 20例に、1. 0×10⁹CFU/0. 5mlのA S 2 株を3日間連続経口投与し、その1日後にL P S 10mg/kgを静脈内投与した。下痢の発現開始時間を個体ごとに、L P S 投与から3時間後までの糞排泄量をケージごとに測定した。対照群にはA S 2 株の代わりに0. 5mlの滅菌水を投与した。その結果を表 8 に示した。

表 8 バチルス・ズブチルス・AS2株の抗下痢作用

試験群	検査項目	下痢開始時間 (分)	糞便量 (g)
対照群		36. 8± 8. 1	2. 93±1. 16
A S 2 株		76. 8±12. 2	0. 47±0. 14

実施例 1 2 A S 2 株の鶏糞に対する消臭効果

鶏糞10gにA S 2 株 2×10¹¹CFU/gをそれぞれ0. 05、0. 5、5、50mg添加して (それぞれ10⁶、10⁷、10⁸、10⁹CFU/g鶏糞に相当) 室温保存し、2、3、4および7日後に消臭効果を判定した。官能テストにより、◎：著効 (よく消臭して

いる、または不快感がない)、○:有効(消臭効果あり)、△:やや有効(臭いは残るが不快感が改善される)、×:無効(消臭効果なし、または、消臭効果あっても不快感あり)の4段階で評価した。

陰性対照群として無添加群を設けた。その結果、AS2株は鶏糞に対して消臭効果を示した(表9)。

表9 パチス・ス・パチス・AS2株の消臭効果

試験区	添加後日数	2 日後	3 日後	4 日後	7 日後
	対照群（無添加群）	×	×	×	×
AS 2 株	10 ₆ /1g鶏糞	×	×	△	○
AS 2 株	10 ₇ /1g鶏糞	△	△	○	◎
AS 2 株	10 ₈ /1g鶏糞	○	◎	◎	◎
AS 2 株	10 ₉ /1g鶏糞	◎	◎	◎	◎

実施例13 AS2株の成長促進作用

一群各5例の雄マウス(SLC:ICR、3週齢、体重10~12g)に、 3.125×10^4 、 1.25×10^5 、 5×10^5 または 2×10^6 CFU/gの濃度でAS2株を添加したマウス用飼料(商品名MF、オリエンタル酵母(株))で28日間飼育し、体重増加量および体重増加率を算出した。その結果、AS2株を添加した群では、いずれも対照群と比較して増体効果が用量依存的にみられた(表10)。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

表10 バチルス・スブチリス・AS2株の成長促進効果

試験群	菌数 (CFU/g)	体 重	
		増加量 (g)	増加率 (%)
対照群	0	25.6 (100) ¹⁾	1.81 (100) ¹⁾
AS2株 添加群 1	3.125×10^4	27.5 (107) *	1.94 (107)
AS2株 添加群 2	1.25×10^5	28.3 (111) *	2.00 (110)
AS2株 添加群 3	5×10^5	28.6 (112) *	2.02 (112)
AS2株 添加群 4	2×10^6	29.3 (114) **	2.07 (114)

1) : 対照群を100としたときの各群の相対値

Williams型多重比較、**: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.05$

実施例 14 AS2株のフルオロウラシル (5-FU) 免疫抑制に対する防御効果

一群各5例の雄マウス (SLC:ICR、5週齢) に生理食塩液に懸濁したAS2株 10^9 CFU/0.5mlを9日間連続経口投与した。投与4日目には5-FU 500mg/kg (フルオロウラシル注射液) も経口投与した。5-FU投与から18日後のマウスの生残率を算出した (表11)。

表11 バチルス・スブチリス・AS2株の5-FU免疫抑制に対する防御効果

試験群	生残数 (率、%)
対照群	0 / 10
AS2株 10^9 CFU/mouse	5 / 10*

 χ^2 テスト、*: $p < 0.05$

実施例 15 AS2株の遺伝学的性状の解析

Ribosomal-RNA 16Sの塩基配列をマイクロセック 16Sr RNA Gene kit (商品名、

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

アプライド・バイオシステム社製)を用いて解析した。すなわち、各菌株の平板上の集落を釣菌し溶菌後、鋳型を調製してPCR法で増幅後、ABI plasma 310 Genetic analyzer (商品名、パーキン・エルマー社製)を用いてシーケンスを行った。

その結果、AS 2株 (配列番号1) と枯草菌の標準株であるNCD01769株 (配列番号2) の塩基配列は4カ所異なることがわかった。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

請求の範囲

1. ラクトースおよびアミグダリン利用能を有し、イヌリン利用能を有さないことを特徴とするバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)。
2. オルソニトロフェノール- β -D-ガラクトピラノシドテストが陰性であることを特徴とするバチルス・ズブチリス。
3. 50℃で生育しないことを特徴とするバチルス・ズブチリス。
4. バチルス・ズブチリスがバチルス・ズブチリス・AS2株 (*Bacillus subtilis* AS2)、寄託番号FERM BP-6139である請求項1～請求項3のいずれか1項に記載のバチルス・ズブチリス。
5. 配列番号1に示した16SリボソームRNAの塩基配列を有するバチルス・ズブチリス・AS2株 (*Bacillus subtilis* AS2) であり、寄託番号FERM BP-6139である請求項1～請求項3のいずれか1項に記載のバチルス・ズブチリス。
6. 請求項1～請求項5のいずれか1項に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分。
7. 請求項6に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分を有効成分とする抗菌剤。
8. 作用を増強する賦形剤と請求項7記載の抗菌剤を含む抗菌剤組成物。
9. 作用を増強する賦形剤として酵母を含む請求項8記載の抗菌剤組成物。
10. 請求項6に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分を有効成分として含む免疫増強剤。
11. 請求項6に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の抗菌有効量を抗菌を必要とする場所に適用することによる抗菌方法。
12. 請求項6に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の有効量を入または動物に投与して、感染症を予防または治療する方法。

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

- 1 3. 請求項 6 に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の有効量を人または動物に投与して、免疫を増強する方法。
- 1 4. 請求項 6 に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の有効量を人または動物に投与して、下痢を予防または治療または整腸する方法。
- 1 5. 請求項 6 に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の有効量を人または動物に投与して、糞便を消臭する方法。
- 1 6. 請求項 6 に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の有効量を人または動物に投与して、成長を促進する方法。
- 1 7. 請求項 6 に記載のバチルス・ズブチリスの生菌、死菌または菌体成分の有効量を人または動物に投与して、抗癌剤の投与に伴う副作用を軽減する方法。
- 1 8. 請求項 7 に記載の抗菌剤と食品を含む食用製品。
- 1 9. 請求項 7 に記載の抗菌剤と家畜または養殖魚用飼料とを含む飼料製品。

図 1

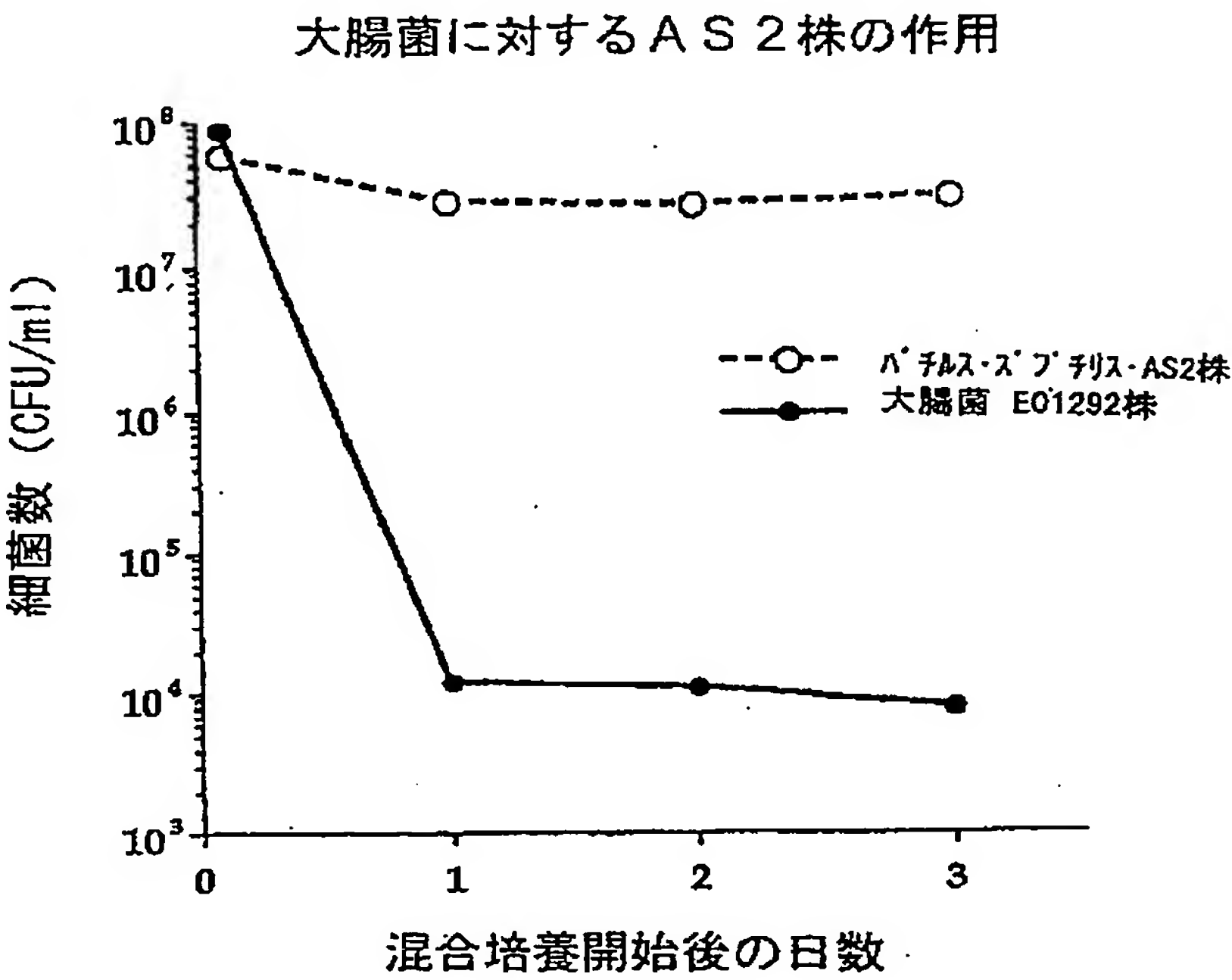


図 2

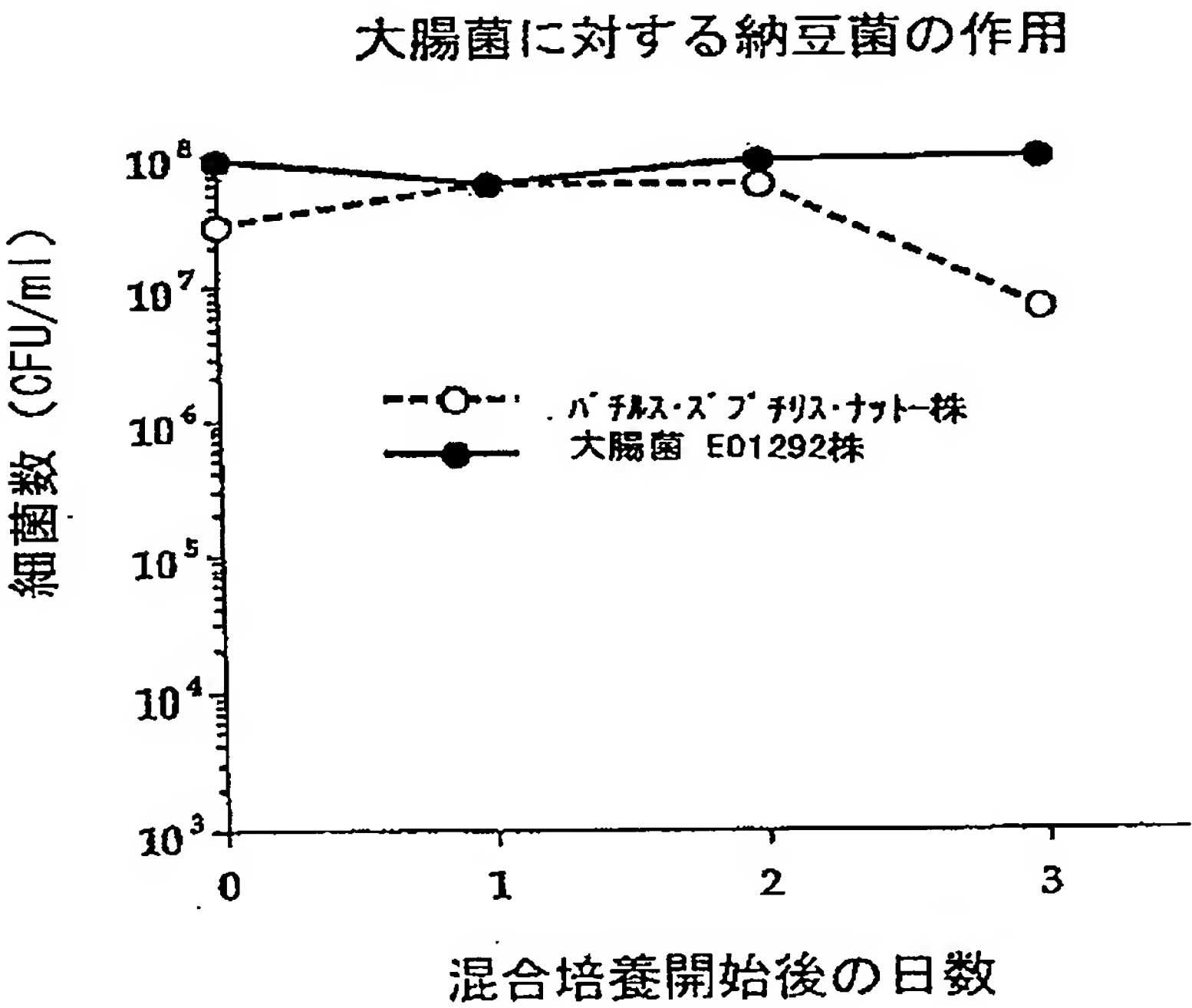
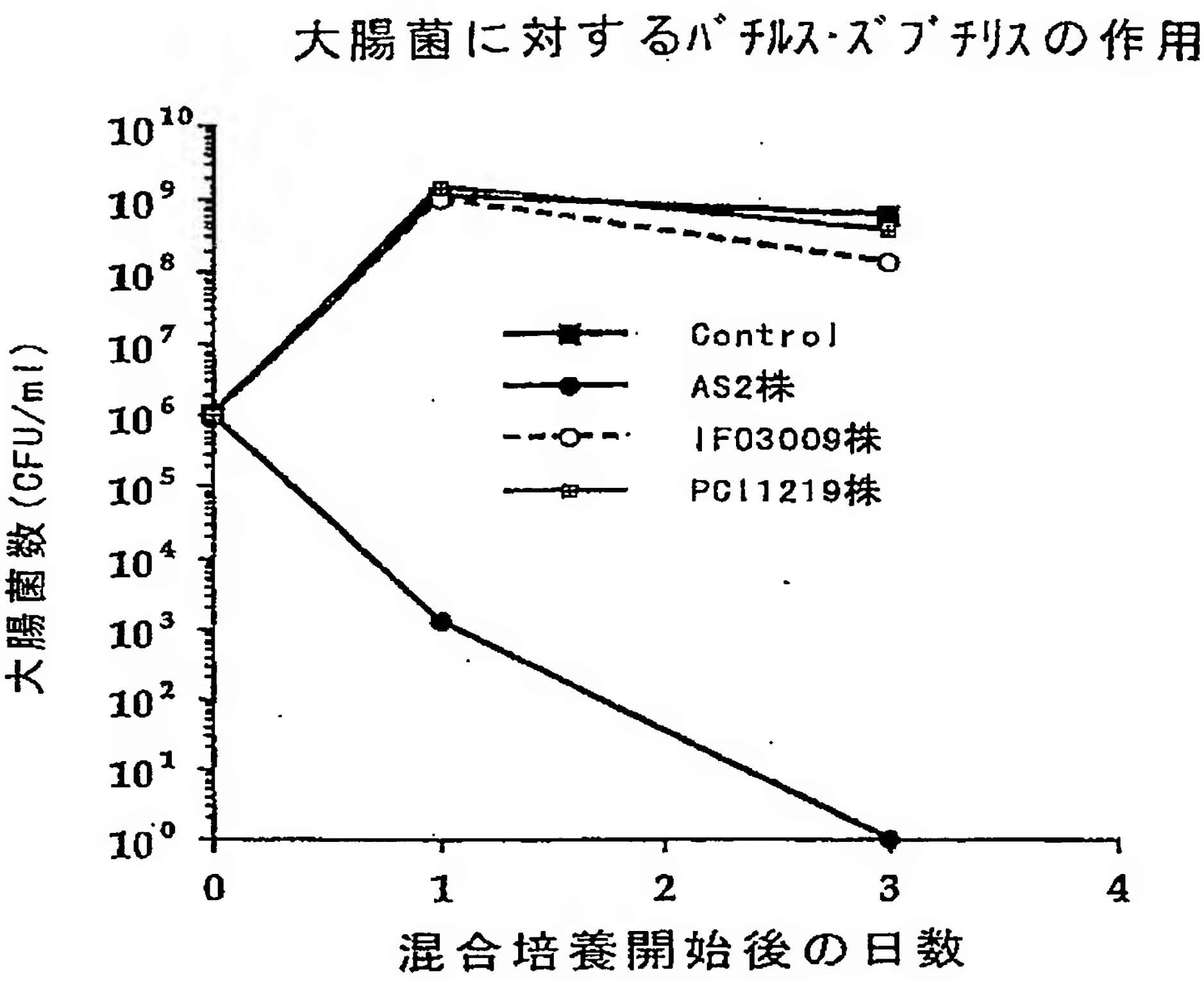


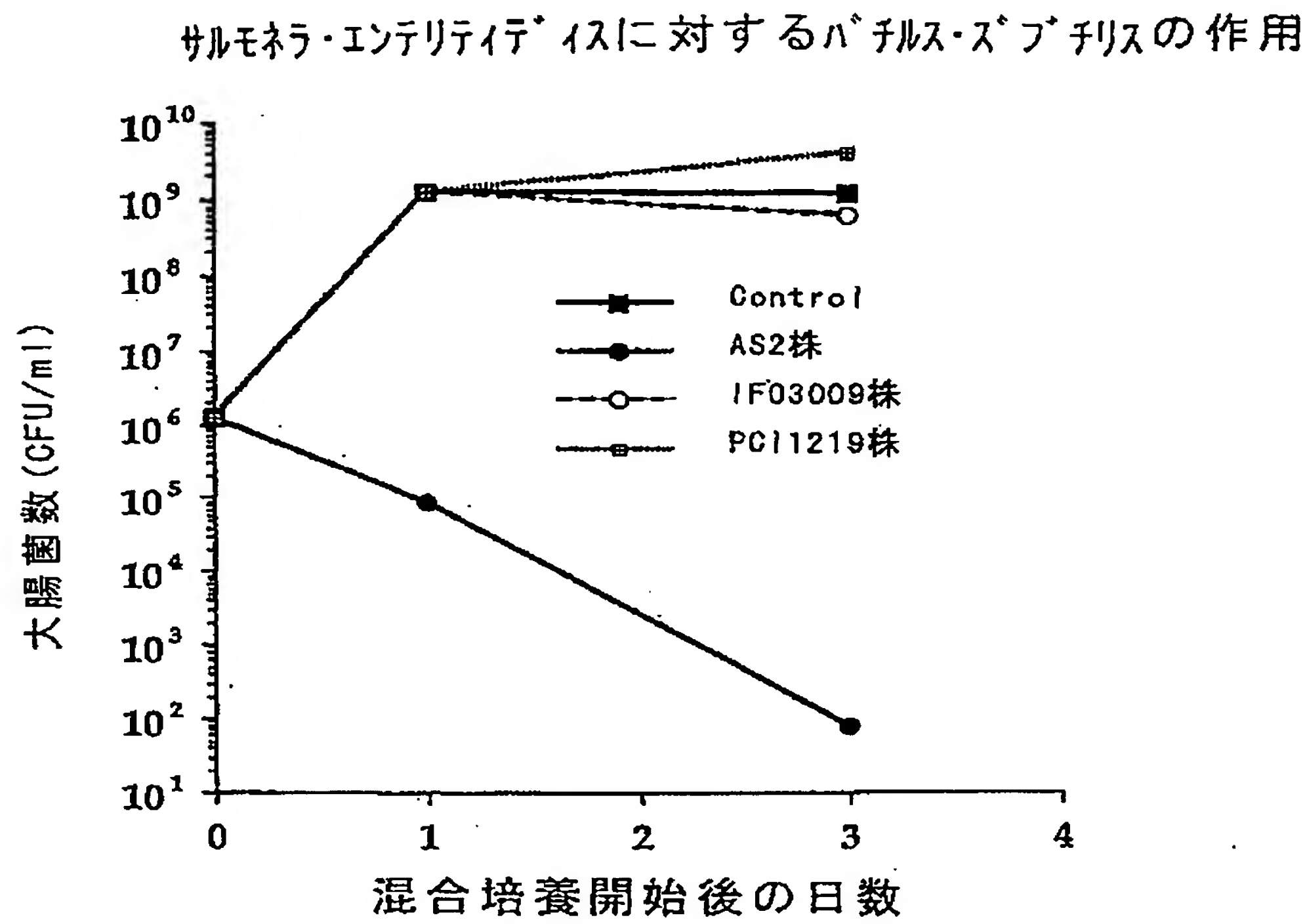
図 3



WO 99/28441

PCT/JP98/05404

図 4



WO 99/28441

PCT/JP98/05404

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1455

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源

生物名 : バチルス スプツリル (Bacillus subtilis)

株名 : AS2

配列 :

GACGAACGCT GCGGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACAGATGG GAGCTTGCTC	60
CCTGATGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCTGTA AGACTGGGAT	120
AACTCCGGGA AACCAGGGCT AATACCGGAT GGTGTCTGA ACCGCATGGT TCAGACATAA	180
AAGGTGGCTT CGGCTACCAC TTACAGATGG ACCCGCGGCG CATTAGCTAG TTGGTGAGGT	240
AACGGCTCAC CAAGGCGACG ATCGGTAGCC GACCTGAGAG GGTGATCGGC CACACTGGGA	300
CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCG CAATGGACGA	360
AAGTCTGACG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA TGAAGGTTTT CGGATCGTAA AGCTCTGTTG	420
TTAGGGAAGA ACAAGTCCCG TTCAAATAGG GCGGCACCTT GACGGTACCT AACCAGAAAG	480
CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAA	540
TTATTGGGCG TAAAGGGCTC GCAGGCGGTT TCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCCCGGCTC	600
AACCGGGGAG GGTCATTGGA AACTGGGGAA CTTGAGTGCA GAAGAGGAGA GTGGAATTCC	660
ACGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATGTG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTCTCT	720
GGTCTGTAAC TGACGCTGAG GAGCGAAAGC GTGGGGAGCG AACAGGATTA GATACCCTGG	780
TAGTCCACGC CGTAAACGAT GAGTGCTAAG TGTTAGGGGG TTTCCGCCCC TTAGTGCTGC	840
AGCTAACGCA TTAAGCACTC CGCCTGGGGA GTACGGTCGC AAGACTGAAA CTCAAAGGAA	900
TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC	960
CTTACCAGGT CTTGACATCC TCTGACAATC CTAGAGATAG GACGTCCCCT TCGGGGGCAG	1020
AGTGACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCC	1080

WO 99/28441

PCT/JP98/05404

CAACGAGCGC AACCTTGAT CTTAGTTGCC AGCATTCACT TGGGCACTCT AAGGTGACTG 1140
CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTATGACCTG 1200
GGCTACACAC GTGCTACAAT GGACAGAACA AAGGGCAGCG AAACCGCGAG GTTAAGCCAA 1260
TCCCACAAAT CTGTTCTCAG TTCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT GAAGCTGGAA 1320
TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC 1380
GCCCCGCACA CCACGAGAGT TTGTAACACC CGAAGTCGGT GAGGTAACCT TTATGGAGCC 1440
AGCCGCCGAA GGTGG 1455

配列番号 : 2

配列の長さ : 1553

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic RNA

起源

生物名 : バチルス スブチリス (Bacillus subtilis)

株名 : NCD01769

配列 :

TTTATCGGAG AGTTTGATCC TGGCTCAGGA CGAACGCTGG CGGCGTGCCT AATACATGCA 60
AGTCGAGCGG ACAGATGGGA GCTTGCTCCC TGATGTTAGC GCGGGACGGG TGAGTAACAC 120
GTGGGTAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGGATGG 180
TTGTTTGAAC CGCATGGTTC AACATAAAA GGTGGCTTCG GCTACCACTT ACAGATGGAC 240
CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA 300
CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA 360
GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGACGAAA GTCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGATG 420
AAGGTTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTTGTT AGGGAAGAAC AAGTACCGTT CAAATAGGGC 480
GGCACCTTGA CGGTACCTAA CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA 540
ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGCTCGC AGGCGGTTTC 600
TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC CCCGGCTCAA CCGGGGAGGG TCATTGGAAA CTGGGGAAC 660
TGAGTGCAGA AGAGGAGAGT GGAATTCCAC GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GAGATGTGGA 720

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N1/20, A61K35/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N1/00-7/08, A61K35/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 1-121219, A (The Calpis Food Industry Co., Ltd.), 12 May, 1989 (12. 05. 89) (Family: none)	1-11, 18, 19
A	JP, 4-166080, A (Korea Research Institute of Chemical Technology), 11 June, 1992 (11. 06. 92) & US, 5155041, A & EP, 536455, A1 & KR, 9301383, B & KR, 9301870, B	1-11, 18, 19
A	JP, 4-169191, A (Korea Research Institute of Chemical Technology), 17 June, 1992 (17. 06. 92) & US, 5155041, A & EP, 536455, A1 & KR, 9301383, B & KR, 9301870, B	1-11, 18, 19
A	JP, 63-273470, A (Agricultural Genetics Co., Ltd.), 10 November, 1988 (10. 11. 88) & EP, 276132, A & US, 5344647, A	1-11, 18, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
9 February, 1999 (09. 02. 99)Date of mailing of the international search report
23 February, 1999 (23. 02. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/05404

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kunst, F. et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ", <i>Nature</i> (November, 1997) Vol. 390, No. 20 p.249-256	1-11, 18, 19
A	Yasumoto, K. et al., "Sequence analysis of a 50 kb region between <i>spoOH</i> and <i>rrnH</i> on the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome", <i>Microbiology</i> (1996) Vol. 142, No. 11 p.3039-3046	1-11, 18, 19
A	Liu, H. et al., "Sequence and analysis of a 31 kb segment of the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome in the area of the <i>rrnH</i> and <i>rrnG</i> operons", <i>Microbiology</i> (August, 1997) Vol. 143, No. 8 p.2763-2767	1-11, 18, 19
A	Cummings, N.J. et al., "The <i>Bacillus subtilis</i> 168 chromosome from <i>sspE</i> to <i>kataA</i> ", <i>Microbiology</i> (June, 1997) Vol. 143, No. 6 p.1855-1859	1-11, 18, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05404

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12-17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12 to 17 relate to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to subject matters which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 98/05404	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl [*] C12N 1/20, A61K 35/74			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl [*] C12N 1/00-7/08, A61K 35/74			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP, 1-121219, A (カルピス食品工業株式会社) 12.5月.1989 (12.05.89) パテントファミリー無し	1-11, 18, 19	
A	JP, 4-166080, A (財団法人 韓国化学研究所) 11.6月.1992 (11.06.92) & US, 5155041, A & EP, 536455, A1 & KR, 9301383, B & KR, 9301870, B	1-11, 18, 19	
A	JP, 4-169191, A (財団法人 韓国化学研究所) 17.6月.1992 (17.06.92) & US, 5155041, A & EP, 536455, A1 & KR, 9301383, B & KR, 9301870, B	1-11, 18, 19	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 09.02.99		国際調査報告の発送日 23.02.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/05404

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 63-273470, A (アグリカル・ケミカル、ジェネティクス、カンパニー、リミテッド) 10.11月.1988 (10.11.88) & EP, 276132, A & US, 5344647, A	1-11, 18, 19
A	Kunst, F. et al. "The complete genome sequence of the Gram- positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ", <i>Nature</i> (November, 1997) 第390巻, 第20号 p. 249-256	1-11, 18, 19
A	Yasumoto, K. et al. "Sequence analysis of a 50 kb region bet- ween <i>spo0H</i> and <i>rrnH</i> on the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome", <i>Microbiology</i> (1996) 第142巻, 第11号 p. 3039-3046	1-11, 18, 19
A	Liu, H. et al. "Sequence and analysis of a 31 kb segment of the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome in the area of the <i>rrnH</i> and <i>rrnG</i> operons", <i>Microbiology</i> (August, 1997) 第143巻, 第8号 p. 2763-2767	1-11, 18, 19
A	Cummings, N. J. et al. "The <i>Bacillus subtilis</i> 168 chromosome from <i>sspE</i> to <i>kata</i> ", <i>Microbiology</i> (June, 1997) 第143巻, 第6号 p. 1855-1859	1-11, 18, 19

国际出願番号 PCT/JP98/05404

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 請求の範囲 12-17 は、人の身体の治療による処置方法であるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.